

基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.003475

线粒体靶向抗氧化剂 Mito-Tempo 对脓毒症小鼠急性肝损伤的保护作用

谢珂, 徐昉

(重庆医科大学附属第一医院重症医学科, 重庆 400016)

【摘要】目的:探讨线粒体靶向抗氧化剂 Mito-Tempo 对脓毒症小鼠急性肝损伤的影响及可能机制。**方法:**将 C57BL/6 小鼠随机分为对照组 (Control 组)、盲肠结扎穿刺组 (CLP 组)、Mito-Tempo 治疗组 (CLP+Mito-Tempo 组)。采用盲肠结扎穿刺术 (cecal ligation and puncture, CLP) 构建小鼠脓毒症急性肝损伤模型, CLP+Mito-Tempo 组在 CLP 处理前 1 h 使用 Mito-Tempo 腹腔注射进行预处理。24 h 后麻醉并处死小鼠, 取小鼠肝脏组织进行 HE 染色观察肝组织病理损伤; ELISA 法监测血清中炎症因子, 免疫荧光染色检测肝组织中活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 的水平; 电镜观察线粒体形态, Western blot 法检测细胞焦亡相关蛋白剪切型含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶-1 (cleaved cysteinyl aspartate specific proteinase 1, cleaved-Caspases-1)、剪切型焦孔素 D (cleaved-gasdermin D, GSDMD)、白细胞介素-1 α (interleukin 1 α , IL-1 α)、白细胞介素-1 β (interleukin 1 β , IL-1 β) 的表达水平。**结果:**与 Control 组相比, CLP 组肝损伤加重, ROS 水平增加, 线粒体形态出现破坏, 细胞焦亡相关蛋白 cleaved-Caspase-1、cleaved-GSDMD、IL-1 α 、IL-1 β 的表达水平增加; 与 CLP 组相比, CLP+Mito-Tempo 组肝组织损伤程度减轻, ROS 水平降低, 线粒体形态部分恢复, 细胞焦亡相关蛋白 cleaved-Caspase-1、cleaved-GSDMD、IL-1 α 、IL-1 β 的表达水平降低。**结论:** Mito-Tempo 可以减轻脓毒症小鼠急性肝损伤, 其机制可能与降低氧化应激水平抑制细胞焦亡的发生有关。

【关键词】脓毒症; 急性肝损伤; 氧化应激; 细胞焦亡**【中图分类号】**R575**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2024-03-12

Protective effect of the mitochondria-targeted antioxidant Mito-Tempo against acute liver injury in mice with sepsis

Xie Ke, Xu Fang

(Department of Critical Care Medicine, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the effect of the mitochondria-targeted antioxidant Mito-Tempo on acute liver injury in mice with sepsis and its possible mechanisms. **Methods:** C57BL/6 mice were randomly divided into control group (Control group), cecal ligation puncture group (CLP group), and Mito-Tempo treatment group (CLP+Mito-Tempo group). Cecal ligation and puncture (CLP) was used to establish a mouse model of sepsis and acute liver injury, and the mice in the CLP+Mito-Tempo group were pretreated with intraperitoneal injection of Mito-Tempo at 1 hour before CLP treatment. After 24 hours, the mice were anesthetized and sacrificed, and HE staining was used to observe liver histopathological injury; ELISA was used to measure the serum levels of inflammatory factors, and immunofluorescent staining was used to measure the level of reactive oxygen species (ROS) in liver tissue; an electron microscope was used to observe the morphology of mitochondria; Western blot was used to measure the expression levels of cleaved cysteinyl aspartate specific proteinase 1 (cleaved caspase-1), cleaved gasdermin D (GSDMD), interleukin-1 α (IL-1 α), and interleukin-1 β (IL-1 β). **Results:** Compared with the Control group, the CLP group had aggravation of liver injury, an increase in ROS level, destroyed mitochondrial morphology, and increases in the expression levels of the pyroptosis-related proteins cleaved caspase-1, cleaved GSDMD, IL-1 α , and IL-1 β . Compared with the CLP group, the CLP+Mito-Tempo group had alleviation of liver injury, a reduction in ROS level, partial restoration of mitochondrial morphology, and significant reductions in the expression levels of the pyroptosis-related proteins cleaved caspase-1, cleaved GSDMD, IL-1 α , and IL-1 β . **Conclusion:** Mito-Tempo can alleviate acute liver injury in mice with sepsis, possibly by reducing the level of oxidative stress and inhibiting pyroptosis.

【Key words】sepsis; acute liver injury; oxidative stress; pyroptosis

作者介绍: 谢珂, Email: 495067613@qq.com,

研究方向: 脓毒症及其器官功能障碍潜在发病机制及治疗。

通信作者: 徐昉, Email: xufang828@126.com。

基金项目: 重庆市科卫联合重点资助项目 (编号: 2023ZDXM004)。

优先出版: <https://link.cnki.net/urlid/50.1046.R.20240418.1534.030>

(2024-04-22)

脓毒症是宿主因感染引起的反应失调而导致危及生命的器官功能障碍,病死率高达 20%~30%^[1]。肝脏是人体参与免疫、代谢和解毒等生理过程的重要器官,因其解剖结构和生理功能的特殊性,使肝脏成为脓毒症发生发展过程中最易受损的器官,脓毒症相关性肝损伤是导致脓毒症患者死亡的独立危险因素^[2],目前研究证实,肝功能损伤可发生在脓毒症任何阶段,受损的肝细胞可触发损伤相关分子模式(damage-associated molecular patterns, DAMPs),级联激活放大全身炎症反应,加重肝脏和其他重要脏器功能障碍,进而增加患者的治疗难度,严重影响脓毒症患者的预后^[3]。因此,积极探究脓毒症患者并发肝损伤的原因,寻找改善脓毒症相关性肝损伤的治疗靶点和药物,对改善脓毒症患者预后,降低病死率至关重要。

脓毒症的特点是免疫反应过度激活,从而引发广泛的炎症反应。现阶段研究认为,氧化应激(oxidative stress, OS)是导致脓毒症相关肝损伤的重要机制^[4],OS被认为是活性氧(reactive oxygen species, ROS)的产生和清除之间的不平衡,它不仅可直接导致基因毒性损伤(DNA 损伤),过量的 ROS 还可刺激肝细胞释放白细胞介素-6(interleukin 6, IL-6)、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)- α 等促炎细胞因子,触发炎症级联反应,放大炎症效应,导致肝损伤^[5]。事实上,ROS 和炎症具有相互促进的作用,并形成恶性反馈回路,造成组织持续损伤。最近的研究表明,ROS 可通过激活 Nod 样受体蛋白 3(nod-like receptor protein 3, NLRP3)炎性小体而导致细胞焦亡^[6]。作为 1 种促炎性质的程序性细胞死亡新方式,细胞焦亡被证明与脓毒症的发生发展密切相关^[7]。因此,推断出过量的 ROS 通过诱发细胞焦亡加重了脓毒症相关性急性肝损伤,通过减少 ROS 的产生可能成为调控脓毒症炎症反应的潜在治疗策略。

线粒体是细胞能量代谢的重要细胞器,也是 ROS 产生的主要来源^[8]。目前的研究表明,线粒体 ROS(mtROS)可直接刺激促炎细胞因子的产生,加重脓毒症、自身免疫性疾病和心血管疾病^[9],同时,线粒体也易遭受 ROS 的直接攻击而导致线粒体功能障碍,而这也被认为是脓毒症相关器官功能障碍的主要发病机制之一^[10]。因此,线粒体靶向抗氧化

疗法被提出可作为炎症性疾病和癌症的新疗法^[11]。Mito-Tempo 是 1 种靶向作用于线粒体的抗氧化剂,具有很强的抗氧化活性,它的治疗作用已在各种疾病中得到广泛证实,Mito-Tempo 可通过恢复小鼠心脏线粒体的功能来改善烧伤引起的心功能损伤^[12],还可通过抑制细胞凋亡来减轻醛固酮导致的肾小管损伤^[13]。然而,Mito-Tempo 在脓毒症诱导的急性肝损伤中的作用仍不确定,本研究旨在探讨 Mito-Tempo 对脓毒症诱导的肝损伤的保护作用及其相关分子机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

C57BL/6 野生型雄性小鼠采购于重庆医科大学实验动物中心,饲养于重庆医科大学实验动物中心 SPF 级动物房。小鼠平均年龄 8~12 周,体质量 18~25 g。实验开始前,所有动物均在动物房适应性喂养 7 d,室温维持在(22 \pm 2) $^{\circ}$ C,给予昼夜节律光照,正常给予水和食物。实验过程中所有操作及步骤均遵守国家条例规范和重庆医科大学动物管理委员会的批准。

1.2 方法

1.2.1 盲肠结扎穿刺术(cecal ligation and puncture, CLP)诱导的脓毒症小鼠肝损伤模型 参照先前描述的方法,通过 CLP 诱导脓毒症小鼠肝损伤模型^[14]。随机抽取小鼠,使用动物麻醉机(RWD,美国),以异氟烷吸入方式麻醉小鼠,刺激小鼠无反应视为麻醉充分。固定、备皮、碘伏消毒后,于腹中线剪开小鼠皮肤,切口 1 cm 左右,并依次打开肌肉层及腹膜,使用眼科镊暴露腹腔,并寻找盲肠,轻轻将盲肠末端夹出腹部切口,距离小鼠盲肠末端 1 cm 处结扎盲肠,并使用 21(gauge, G)针头穿刺结扎远端盲肠,并挤出少量盲肠内容物后将盲肠还纳入腹腔,使用 3~0 丝线逐层缝合肌肉层及皮肤层,完成小鼠 CLP 模型的制备。假手术组分离盲肠后不结扎,不穿孔,送回腹腔原位置,其余操作均相同。处理完毕后,将小鼠放回更换新鲜垫料的笼子自由进食水。

1.2.2 Mito-Tempo 处理小鼠 随机抽取小鼠,并分为对照组(Control 组, $n=5$),急性肝损伤组(CLP 组, $n=5$) Mito-Tempo 治疗组(CLP+Mito-Tempo 组, $n=5$)。造模前,提前紫外灯照射工作台消毒,称小鼠重量并记录。在行 CLP 操作前 1 h,通过腹腔注射的方式,按照体质量比例给予 CLP+Mito-Tempo 组小鼠 20 mg/kg 的 Mito-Tempo(Sigma, USA),Control 组给予同剂量的磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffer, PBS),术后将各组小鼠重新放置于无特定病原体环境的动物房中饲养,并观察、记录小鼠整体状态和疾病情况,模型后 24 h 取标本。

1.2.3 血清细胞因子测定 采集全血,室温下凝固 1 h 后,于 1 000 g 离心 15 min,取上清即为血清,分装保存于液氮,溶解后可直接用于检测,用 ELISA 试剂盒 (EBio 科学公司,美国)检测血清中 IL-6、白细胞介素-10(interleukin 10, IL-10)和 TNF- α 的水平,用谷丙转氨酶 (alanine aminotransferase, ALT)和谷草转氨酶 (aspartate aminotransferase, AST)检测试剂盒检测血清 ALT 和 AST 水平。

1.2.4 组织病理学 将肝组织进行固定、包埋、切片,用 HE 染色后用光镜评估组织学损伤。肝损伤评分采用先前描述的方法^[15],对以下 6 个指标进行了评分:空泡化、核凝结、核碎裂、核消退、红细胞停滞和炎症细胞浸润。评分根据 5 个显微镜视野 (200 \times)中显示这些现象的细胞百分比:0=0%, 1=0%~<10%, 2=10%~<50%, 3=50%~100%, 总分越高,损伤越严重。

1.2.5 免疫荧光染色 将新鲜冰冻肝组织进行固定、包埋、切片,采用乙二胺四乙酸进行抗原修复,6%牛血清白蛋白封闭后按说明书指示方法添加 MitoSOX Red 染料 (Sigma, USA)同新鲜肝组织切片避光在湿盒中孵育,最后用 4,6-二脒基-2-苯基吲哚对细胞核进行染色。图像通过共聚焦显微镜 (尼康)采集,并使用 Image-Pro Plus 6 软件进行统计分析。

1.2.6 Western blot 使用 RIPA 缓冲液对小鼠肝脏组织进行裂解,提取总蛋白和核蛋白,蛋白样品用 10%~12% SDS-PAGE 分离后电转至 PVDF 膜,按浓度要求稀释液一抗,将条带分别同稀释好的抗小鼠剪切型含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶-1 (cleaved cysteinyl aspartate specific proteinase 1, cleaved-Caspases-1)、剪切型焦孔素 D (cleaved-gasdermin D, GSDMD)、白细胞介素-1 α (interleukin 1 α , IL-1 α)、白细胞介素-1 β (interleukin 1 β , IL-1 β)抗体在 4 $^{\circ}$ C 的湿盒中避光孵育过夜。清洗、孵育二抗后,使用增强化学发光底物显影,使用 Image-Pro Plus 6.0 测量信号强度。

1.2.7 氧化应激水平测定 超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)和脂质过氧化产物丙二醛 (malondialdehyde, MDA)是与氧化应激相关的指标。根据制造商的说明,用 MDA 检测试剂盒 (Beyotime, S0131M)、SOD 检测试剂盒 (Beyotime, S0101M)分别测定脓毒症小鼠血清中的 MDA 和 SOD 的水平,使用酶标仪 (Bio-Rad 仪器)测定发光强度。

1.2.8 电子显微镜评估 新鲜小鼠肝组织固定于 2.5% 戊二醛,进行脱水、包埋后切片,用透射电镜进行拍摄评估。

1.3 统计学方法

用 GraphPad Prism 7.0、SPSS 19.0 完成统计学分析,计量资料采用均数 \pm 标准差 ($\bar{x}\pm s$)表示。组间两两比较采用 SNK- q 检验法。多组数据间比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA),检验水准 $\alpha=0.05$ 。

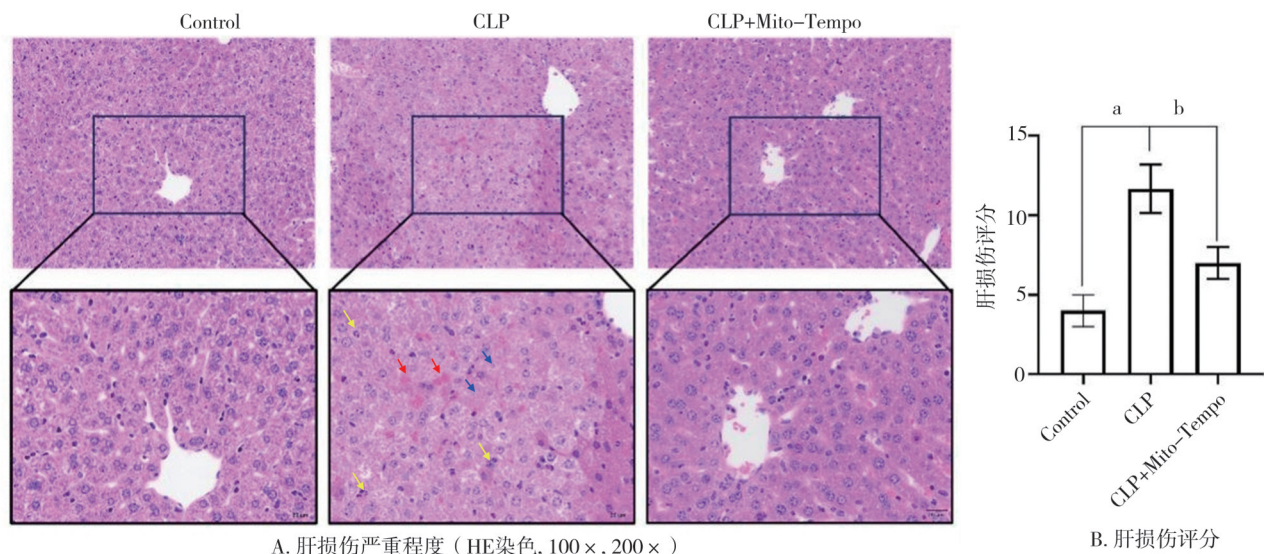
2 结果

2.1 Mito-Tempo 减轻 CLP 诱导的脓毒症小鼠模型肝损伤的严重程度

Control 组、CLP 组和 CLP+Mito-Tempo 组小鼠肝损伤评分分别为 4.00 ± 0.82 , 11.70 ± 1.25 , 7.00 ± 0.81 ,与 Control 组相比,CLP 诱导的脓毒症小鼠模型中肝脏组织出现严重的充血、核碎裂、核溶解、炎症细胞浸润 (如图 1 箭头所示),肝损伤评分较对照组也明显升高 ($q=7.813$, $P=0.000$), Mito-Tempo 预处理可减轻肝损伤的严重程度,与 CLP 组相比,肝损伤评分也降低 ($q=4.756$, $P=0.005$) (图 1)。

2.2 Mito-Tempo 降低 CLP 诱导的脓毒症小鼠模型 ALT 和 AST 表达水平

血清 ALT 和 AST 水平是评估肝损伤最常用的生物标志物,Control 组、CLP 组和 CLP+Mito-Tempo 组血清 ALT 分别为 43.80 ± 8.45 , 291.00 ± 17.60 , 168.00 ± 12.60 , AST 分别为 43.90 ± 8.01 , 245.00 ± 32.70 , 139.00 ± 27.70 ,与 Control 组相



A. 肝损伤严重程度 (HE染色, 100 \times , 200 \times)

B. 肝损伤评分

注:a, $P=0.000$; b, $P=0.005$; 红色箭头示肝组织充血; 黄色箭头示核碎裂; 蓝色箭头示核溶解

图1 Mito-Tempo 减轻脓毒症小鼠肝损伤程度

比, CLP 组的血清 ALT ($q=26.120, P=0.000$) 和 AST 水平 ($q=11.340, P=0.000$) 均明显升高, 而在 CLP+Mito-Tempo 组中, 与 CLP 相比, 血清 ALT ($q=12.970, P=0.000$) 和 AST 的水平 ($q=5.952, P=0.000$) 明显降低 (图 2)。

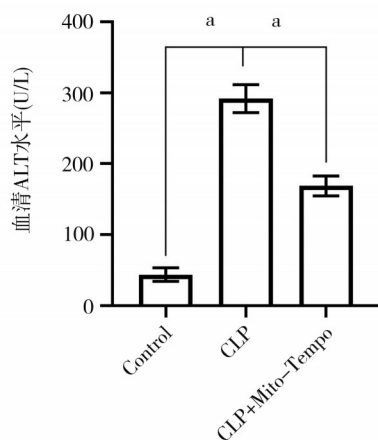
2.3 Mito-Tempo 降低 CLP 诱导的脓毒症小鼠模型血清促炎性细胞因子的表达

本研究检测了对各组小鼠血清中 IL-6、TNF- α 和抗炎细胞因子 IL-10 的表达, Control 组、CLP 组和 CLP+Mito-Tempo 组血清 IL-6 表达水平分别为 47.5 ± 11.1 , 545.0 ± 103.0 , 173.0 ± 27.8 , TNF- α 表达水平分别为 49.40 ± 7.92 , 505.00 ± 73.10 , 150.00 ± 38.70 , IL-10 表达水平分别为 37.3 ± 12.1 , 136.0 ± 25.9 , 329.0 ± 65.1 , 和 Control 组相比, CLP 组促炎性细胞因子 IL-6 ($q=11.290, P=0.000$)、TNF- α ($q=13.340, P=0.000$)、IL-10 ($q=5.330, P=0.001$) 的水平均升高, 与 CLP 相比, Mito-Tempo 预处理后明显降低了 CLP+Mito-Tempo 组 IL-6 ($q=8.440, P=0.000$)、TNF- α ($q=10.460, P=0.000$) 细胞因

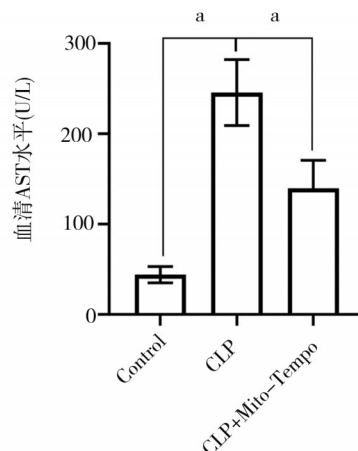
子的表达, 促进了 IL-10 ($q=8.28, P=0.000$) 的表达 (图 3)。

2.4 Mito-Tempo 改善了 CLP 诱导的脓毒症小鼠模型中氧化应激水平

为了评估氧化应激水平, 本研究测定了血清中重要的抗氧化酶 SOD 和 MDA 的水平, Control 组、CLP 组和 CLP+Mito-Tempo 组血清 SOD 表达水平分别为 57.30 ± 6.13 , 28.40 ± 4.01 , 46.70 ± 6.81 , MDA 表达水平分别为 1.62 ± 0.26 , 2.91 ± 0.37 , 1.67 ± 0.28 , 和 Control 组相比, CLP 组 SOD 水平明显降低 ($q=7.080, P=0.000$), 而 MDA 水平升高 ($q=5.861, P=0.000$), 与 CLP 相比, Mito-Tempo 预处理后升高了 SOD ($q=4.494, P=0.001$) 的表达水平, 而降低了 MDA ($q=5.645, P=0.000$) 的表达 (图 4); Control 组、CLP 组和 CLP+Mito-Tempo 组线粒体 ROS 的荧光表达强度分别为 0.57 ± 0.05 , 1.89 ± 0.21 , 0.74 ± 0.13 , 与 CLP 组相比, 线粒体 ROS 的荧光强度在 Mito-Tempo 预处理组中明显降低 ($q=10.740, P=0.000$) (图 5)。



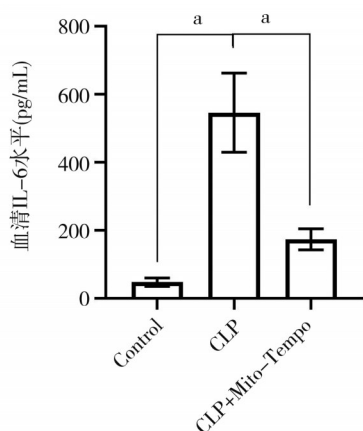
A. 血清ALT水平



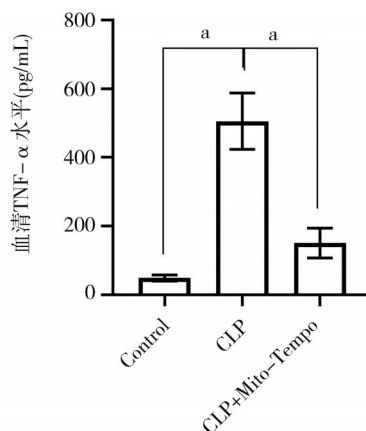
B. 血清AST水平

注: a, $P=0.000$

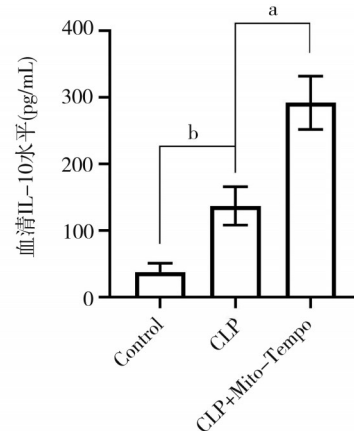
图2 Mito-Tempo降低血清ALT、AST表达水平



A. 血清IL-6水平



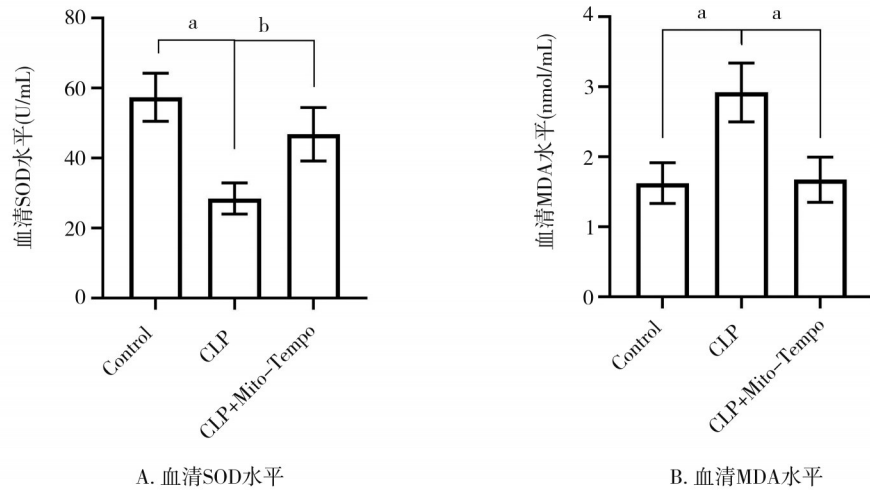
B. 血清TNF- α 水平



C. 血清IL-10水平

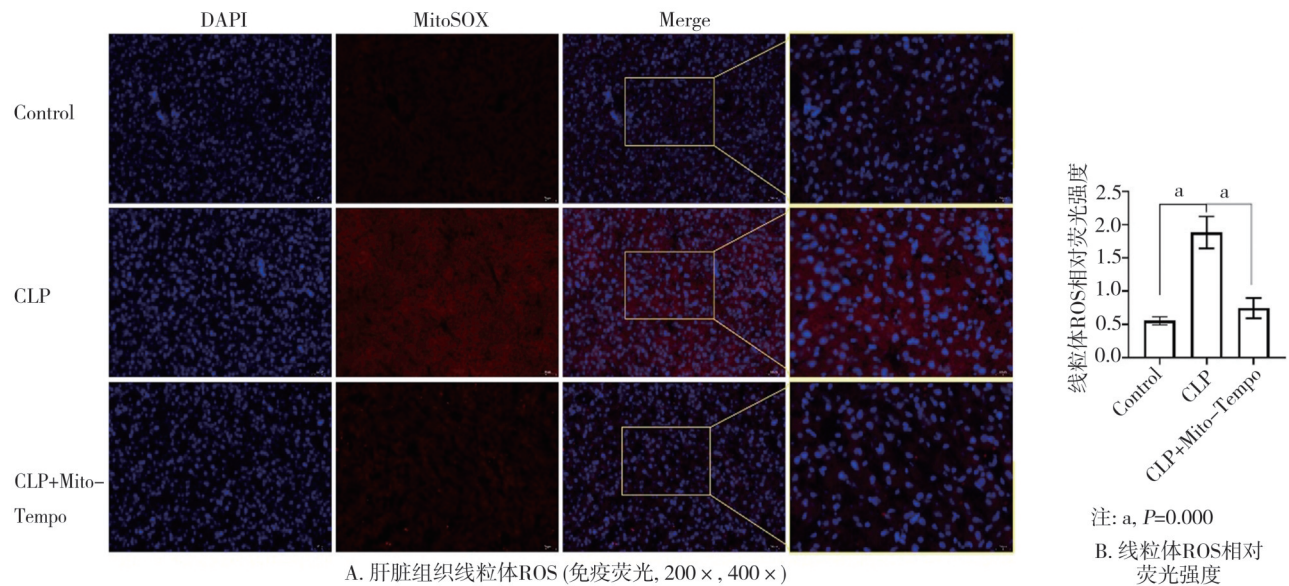
注: a, $P=0.000$; b, $P=0.001$

图3 Mito-Tempo对血清炎症因子表达水平的影响



注: a, $P=0.000$; b, $P=0.001$

图4 Mito-Tempo对小鼠氧化应激血清标志物SOD和MDA的影响



注: a, $P=0.000$

B. 线粒体ROS相对荧光强度

图5 Mito-Tempo对小鼠肝脏组织线粒体ROS的影响

2.5 Mito-Tempo改善了CLP诱导的脓毒症小鼠模型中线粒体形态

线粒体形态同线粒体功能密切相关,通过电镜观察线粒体形态,如图6所示,CLP组肝脏线粒体形态出现肿胀、线粒体膜完整性被破坏,线粒体嵴断裂或缺失,与CLP组相比, Mito-Tempo预处理可恢复线粒体形态。

2.6 Mito-Tempo抑制了CLP诱导的脓毒症小鼠模型肝组织Caspase-1的表达和细胞焦亡的发生

为了探讨 Mito-Tempo 对小鼠肝组织中 Caspase-1 的表达和细胞焦亡的影响,本研究检测了 Caspase-1、GSDMD、IL-1 α 和 IL-1 β 蛋白在肝组织中的表达情况,实验结果发现, CLP 组 cleaved-Caspase-1 蛋白相对表达量 (0.355 ± 0.024) 相较于 Control 组 (0.204 ± 0.023) 明显升高 ($q=6.545, P=0.001$),

而 CLP+Mito-Tempo 组 cleaved-Caspase-1 蛋白相对表达量 (0.270 ± 0.021) 较 CLP 组降低 ($q=3.389, P=0.025$); Control 组、CLP 组和 CLP+Mito-Tempo 组 cleaved-GSDMD 蛋白相对表达量分别为 0.345 ± 0.042 , 0.460 ± 0.027 , 0.365 ± 0.025 , IL-1 α 蛋白相对表达量分别为 0.319 ± 0.038 , 0.609 ± 0.074 , 0.428 ± 0.029 , IL-1 β 蛋白相对表达量分别为 0.261 ± 0.049 , 0.698 ± 0.042 , 0.363 ± 0.028 , 与 Control 组相比, CLP 组 cleaved-GSDMD ($q=3.544, P=0.021$)、IL-1 α ($q=5.659, P=0.000$)、IL-1 β ($q=10.610, P=0.000$) 蛋白表达水平均升高,与 CLP 相比, Mito-Tempo 预处理后降低了 cleaved-GSDMD ($q=2.990, P=0.042$)、IL-1 α ($q=3.354, P=0.021$)、IL-1 β ($q=8.134, P=0.000$) 的表达(图7)。

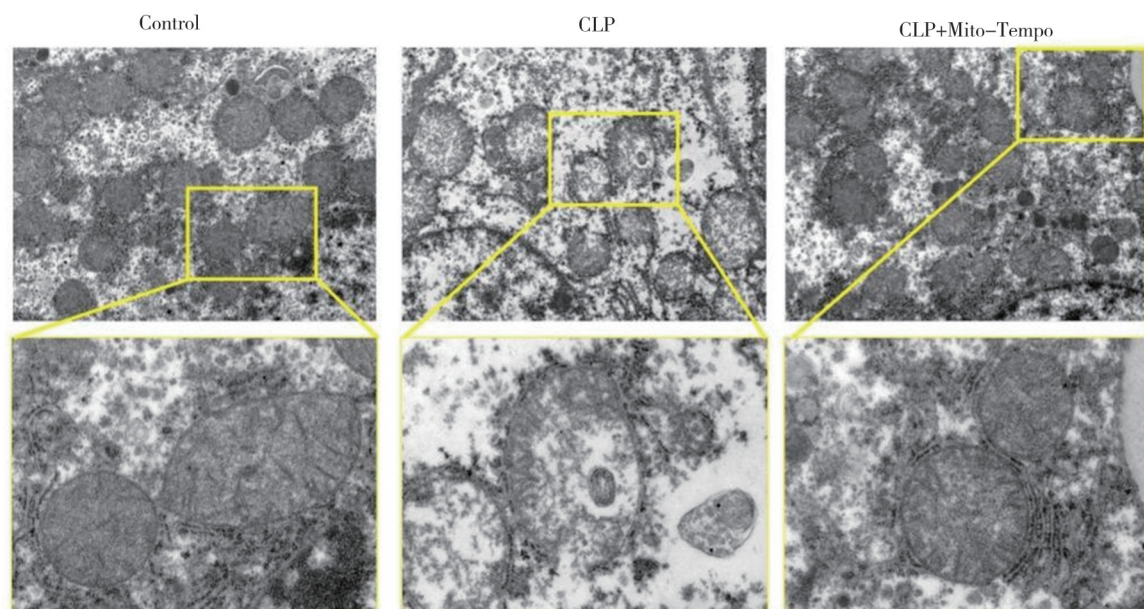
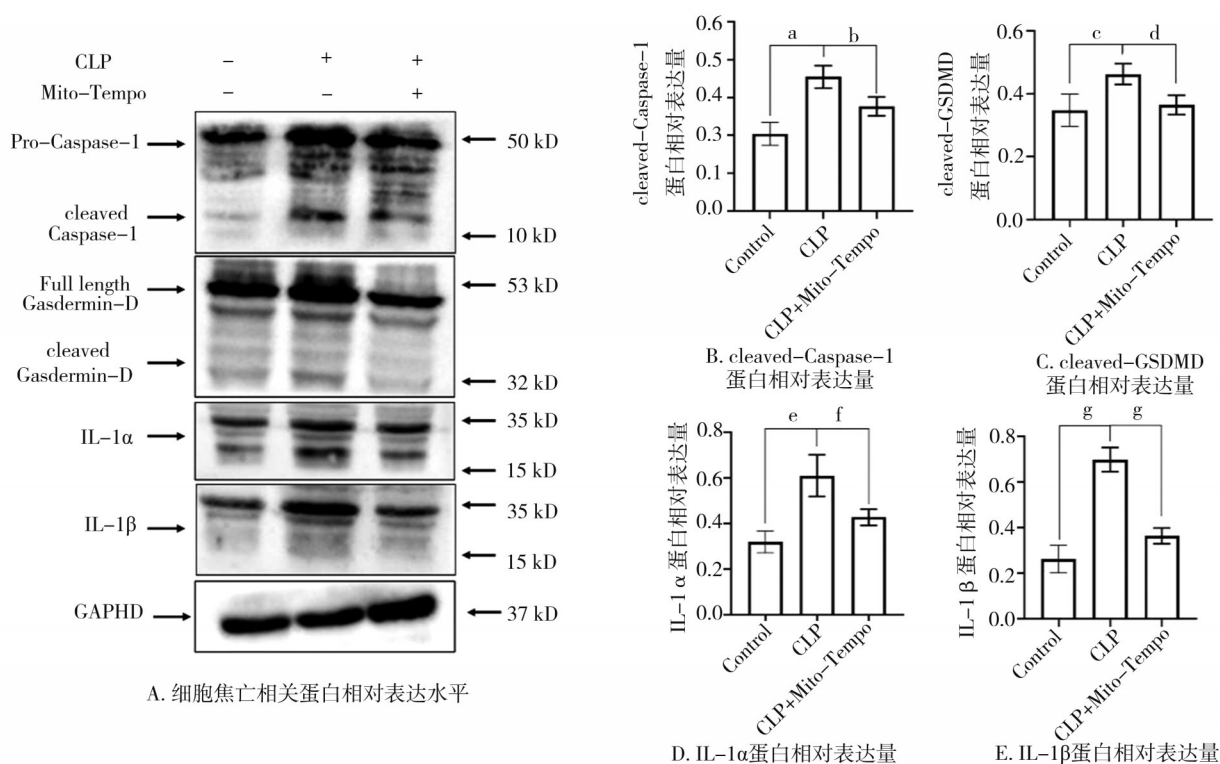


图6 Mito-Tempo对脓毒症小鼠线粒体形态的影响(电镜,5 000 × ,15 000 ×)



注:a, $P=0.001$; b, $P=0.025$; c, $P=0.021$; d, $P=0.042$; e, $P=0.002$; f, $P=0.021$; g, $P=0.000$

图7 Mito-Tempo降低了细胞焦亡相关蛋白的表达水平

3 讨论

炎症反应是机体重要的生物防御机制,但异常激活的炎症反应可导致宿主组织损伤。脓毒症的特征是免疫系统的过度激活,从而引起细胞因子级

联激活放大导致的失控性炎症。脓毒症所致急性肝损伤是导致脓症患者死亡的主要原因之一,对人类健康构成严重威胁^[3],因此,靶向炎症调控,抑制过度的炎症反应对于改善脓症患者预后、降低死亡率具有重要意义。目前研究发现,炎症反应与

氧化应激相偶联,具有抗氧化能力的药物可以有效抑制炎症反应,改善脓毒症患者预后^[16]。线粒体是 ROS 产生的主要来源,靶向线粒体传递抗氧化剂已被认为是治疗脓毒症的新策略。

Mito-Tempo 是一种靶向线粒体的抗氧化剂,具有直接清除线粒体 ROS 的作用,从而最大限度降低氧化应激水平。现有研究证明 Mito-Tempo 可减轻对乙酰氨基酚导致的小鼠急性肝损伤,发挥保护作用^[17],还可通过减少氧化应激,恢复脓毒症小鼠的肾功能,提升小鼠的存活率^[18],也可通过降低炎症反应、改善小鼠心脏线粒体功能,减轻阿霉素导致的心脏毒性^[19]。本研究发现,经 Mito-Tempo 治疗后,与 CLP 组相比,CLP+Mito-Tempo 组肝组织损伤的严重程度有所改善(图 1),同时血清中 ALT 和 AST 的活性也降低(图 2)。血清中促炎细胞因子水平的升高是脓毒症重要的病理生理学特征,本研究观察到,经过 Mito-Tempo 治疗后,小鼠血清中促炎细胞因子 IL-6 和 TNF- α 的表达水平降低(图 3),而抑炎性细胞因子 IL-10 水平表达上升(图 3),这些结果表明,Mito-Tempo 能够缓解 CLP 诱导的脓毒症小鼠的肝功能损伤,调控炎症反应。

氧化应激在肝损伤的发病机制中起着重要作用,1 项关于药物过量致肝损伤的研究发现,过量的对乙酰氨基酚可消耗肝脏还原型谷胱甘肽活性而诱发氧化应激反应,进而加重组织炎症反应,从而导致肝损伤^[20]。事实上,肝脏在全身代谢反应中处于核心地位,负责机体糖异生、糖原储存和脂质的合成等,同时肝脏也是机体重要的免疫调节器官,这使得肝脏更容易遭受包括感染在内的多种因素诱导的氧化应激反应和氧化还原能力的受损,继而导致肝细胞生化和代谢过程的损害,加重肝损伤,因此,减轻氧化应激可成为治疗脓毒症相关肝损伤的潜在策略^[21]。研究指出,氧化应激是细胞内 ROS 的积累与清除能力及抗氧化修复能力之间的不平衡^[22],脓毒症的发生发展与 ROS 的过量产生也密切相关^[23]。因此,进一步研究了 Mito-Tempo 是否通过减轻氧化应激发挥肝脏保护作用。MDA 是脂质过氧化和氧化应激升高的 1 个指标,SOD 水平反应机体是抗氧化能力^[24]。在本研究中,Mito-Tempo 预处理提高了小鼠实验模型血清中 SOD 的活性,降低了

MDA 水平(图 4),此外,还发现 Mito-Tempo 治疗降低了 mtROS 的荧光强度(图 5),这些结果表明 Mito-Tempo 在体内具有较强的抗氧化能力。

线粒体功能障碍是导致脓毒症相关器官功能衰竭的重要原因之一,线粒体形态学改变和 mtROS 水平升高与线粒体功能障碍密切相关^[25]。通过电镜扫描评估肝脏线粒体形态,本研究发现 CLP 组肝脏线粒体出现肿胀、膜完整性被破坏,线粒体嵴断裂或缺失,而 Mito-Tempo 治疗后可部分恢复线粒体形态(图 6),其次,线粒体在调节细胞增殖和程序性死亡方面也发挥着重要作用。目前证据表明,ROS 可作为 NLRP3 炎性小体的激活因子^[26],影响 Caspase-1-GSDMD 通路介导的细胞焦亡的发生,它能以细胞膜破裂和促炎性胞内物质释放的方式进一步放大炎症反应^[27],在脓毒症和脓毒性休克中起着关键作用。因此,ROS 被认为是连接线粒体氧化应激和炎症反应的一个重要指标和关键治疗靶点^[28],本研究结果表明,Mito-Tempo 治疗降低了细胞焦亡相关蛋白 cleaved-Caspase-1、cleaved-GSDMD、IL-1 α 和 IL-1 β 的表达(图 7)。这些结果为 Mito-Tempo 可以通过减轻细胞氧化应激和恢复线粒体功能来抑制 Caspase-1 的激活和细胞焦亡的发生提供了证据。

综上所述,脓毒症可导致线粒体损伤,而线粒体损伤可通过 ROS 的产生引起氧化应激,诱发细胞焦亡,线粒体靶向抗氧化剂 Mito-Tempo 可减轻氧化应激,抑制 Caspase-1 介导的细胞焦亡,调控炎症反应,为药物治疗脓毒症相关肝损伤的提供了新的潜在靶点。

参 考 文 献

- [1] Liu D, Huang SY, Sun JH, et al. Sepsis-induced immunosuppression: mechanisms, diagnosis and current treatment options[J]. Mil Med Res, 2022, 9(1):56.
- [2] Xiao LX, Qi L, Zhang GZ, et al. *Polygonatum sibiricum* polysaccharides attenuate lipopoly-saccharide-induced septic liver injury by suppression of pyroptosis via NLRP3/GSDMD signals[J]. Molecules, 2022, 27(18):5999.
- [3] Yan J, Li S, Li SL. The role of the liver in sepsis[J]. Int Rev Immunol, 2014, 33(6):498-510.
- [4] Luo XY, Jiang XK, Li J, et al. Insulin-like growth factor-1 attenuates oxidative stress-induced hepatocyte premature senescence in liver fibrogenesis via regulating nuclear p53-progerin interaction[J]. Cell

Death Dis, 2019, 10(6):451.

[5] Ge WH, Wang T, Zhao Y, et al. Period1 mediates rhythmic metabolism of toxins by interacting with CYP2E1[J]. Cell Death Dis, 2021, 12(1):76.

[6] Li L, Cui YJ, Liu Y, et al. ATP6AP2 knockdown in cardiomyocyte deteriorates heart function via compromising autophagic flux and NLRP3 inflammasome activation[J]. Cell Death Discov, 2022, 8(1):161.

[7] Xue ZY, Xi Q, Liu HK, et al. miR-21 promotes NLRP3 inflammasome activation to mediate pyroptosis and endotoxic shock[J]. Cell Death Dis, 2019, 10(6):461.

[8] Weinberg SE, Chandel NS. Targeting mitochondria metabolism for cancer therapy[J]. Nat Chem Biol, 2015, 11(1):9-15.

[9] Dominic A, Hamilton D, Abe JI. Mitochondria and chronic effects of cancer therapeutics: the clinical implications[J]. J Thromb Thrombolysis, 2021, 51(4):884-889.

[10] Yu HC, Hou GW, Cao JK, et al. Mangiferin alleviates mitochondrial ROS in nucleus pulposus cells and protects against intervertebral disc degeneration via suppression of NF- κ B signaling pathway[J]. Oxid Med Cell Longev, 2021, 2021:6632786.

[11] Li XY, Fang P, Mai JT, et al. Targeting mitochondrial reactive oxygen species as novel therapy for inflammatory diseases and cancers[J]. J Hematol Oncol, 2013, 6:19.

[12] Wen JJ, Williams TP, Cummins CB, et al. Effect of mitochondrial antioxidant (mito-TEMPO) on burn-induced cardiac dysfunction[J]. J Am Coll Surg, 2021, 232(4):642-655.

[13] Ding W, Guo HL, Xu CY, et al. Mitochondrial reactive oxygen species-mediated NLRP3 inflammasome activation contributes to aldosterone-induced renal tubular cells injury[J]. Oncotarget, 2016, 7(14):17479-17491.

[14] Taylor MD, Fernandes TD, Kelly AP, et al. CD4 and CD8 T cell memory interactions alter innate immunity and organ injury in the CLP sepsis model[J]. Front Immunol, 2020, 11:563402.

[15] Heijnen BH, Straatsburg IH, Gouma DJ, et al. Decrease in core liver temperature with 10 degrees C by *in situ* hypothermic perfusion under total hepatic vascular exclusion reduces liver ischemia and reperfusion injury during partial hepatectomy in pigs[J]. Surgery, 2003, 134(5):806-817.

[16] Silwal P, Kim JK, Kim YJ, et al. Mitochondrial reactive oxygen species: double-edged weapon in host defense and pathological inflammation during infection[J]. Front Immunol, 2020, 11:1649.

[17] Abdullah-Al-Shoeb M, Sasaki K, Kikutani S, et al. The late-

stage protective effect of mito-TEMPO against acetaminophen-induced hepatotoxicity in mouse and three-dimensional cell culture models[J]. Antioxidants, 2020, 9(10):965.

[18] Patil NK, Parajuli N, MacMillan-Crow LA, et al. Inactivation of renal mitochondrial respiratory complexes and manganese superoxide dismutase during sepsis: mitochondria-targeted antioxidant mitigates injury[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2014, 306(7):F734-F743.

[19] Rocha VC, França LS, de Araújo CF, et al. Protective effects of mito-TEMPO against doxorubicin cardiotoxicity in mice[J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2016, 77(3):659-662.

[20] Li Q, Zhang W, Cheng N, et al. Pectolarigenin ameliorates acetaminophen-induced acute liver injury via attenuating oxidative stress and inflammatory response in Nrf2 and PPAR α dependent manners[J]. Phytomedicine, 2023, 113:154726.

[21] Xia T, Zhang J, Yao JH, et al. Shanxi aged vinegar protects against alcohol-induced liver injury via activating Nrf2-mediated antioxidant and inhibiting TLR4-induced inflammatory response[J]. Nutrients, 2018, 10(7):805.

[22] Chen L, Zhu YQ, Zhou J, et al. Luteolin alleviates epithelial-mesenchymal transformation induced by oxidative injury in ARPE-19 cell via Nrf2 and AKT/GSK-3 β pathway[J]. Oxid Med Cell Longev, 2022, 2022:2265725.

[23] Lin WC, Chen CW, Huang YW, et al. Kallistatin protects against sepsis-related acute lung injury via inhibiting inflammation and apoptosis[J]. Sci Rep, 2015, 5:12463.

[24] Liao Y, Lin X, Li JC, et al. Nodakenin alleviates renal ischaemia-reperfusion injury via inhibiting reactive oxygen species-induced NLRP3 inflammasome activation[J]. Nephrology, 2021, 26(1):78-87.

[25] Wu AG, Zhou XG, Qiao G, et al. Targeting microglial autophagic degradation in NLRP3 inflammasome-mediated neurodegenerative diseases[J]. Ageing Res Rev, 2021, 65:101202.

[26] Wang YY, Wang M, Liu YS, et al. Integrated regulation of stress responses, autophagy and survival by altered intracellular iron stores[J]. Redox Biol, 2022, 55:102407.

[27] Sandoval C, Mella L, Godoy K, et al. β -carotene increases activity of cytochrome P450 2E1 during ethanol consumption[J]. Antioxidants, 2022, 11(5):1033.

[28] Coll RC, Schroder K, Pelegrín P. NLRP3 and pyroptosis blockers for treating inflammatory diseases[J]. Trends Pharmacol Sci, 2022, 43(8):653-668.

(责任编辑:曾 玲)